この添付文書をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品

2009 年 2 月作成（第 1 版）

日本標準商品分類番号：877449

製造販売承認番号：21800AMY10100000

NK 細胞キット

ダコ　フローサイトメトリー抗体　ＣＤ５６（Ｃ５．９）／ＲＰＥ

【全般的な注意】

1.本製品は体外診断用医薬品であり，それ以外の目的に使用しないこと。
2.検出結果に基づく臨床診断は，臨床症状や他の検査結果等と併せて，担当医師が総合的に判断すること。
3.添付文書に記載された使用方法及び使用目的以外の使用については，測定結果の信頼性を保証できないので，記載内容に従って使用すること。
4.使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用すること。
5.診断には他の検査も併用すること。
6.一種類の蛍光標識抗体で判定のつかない場合は，複数の項目による検査も行うこと。

【形状・構造等（キットの構成）】

構成試薬

蛍光標識抗体	成分	Clone	Ig Type	特異性
CD56（C5.9）／RPE	RPE 標識モノクローナル抗 CD56（C5.9）・マウス抗体	C5.9	IgG2b, κ	CD56（※1）

※1: 白血球分化抗原に関する国際ワークショップにて分類

【使用目的】

全血中のリンパ球細胞表面抗原（CD56）の分析及び NK 細胞の測定

【測定原理】

本品はモノクローナル抗体（モノクローナル抗 CD56（C5.9）・マウス抗体）に赤色蛍光色素である R-phycoerythrin（RPE）を結合させたものである。
本品は測定原理として，蛍光抗体直接法を用いている。検体に本品を加え，一定条件のもとで反応させると，抗原抗体反応により，目的とする細胞表面抗原の抗原決定基に本品が特異的に結合する。この細胞にフローサイトメーターを用いて励起光を照射し，赤色蛍光を発光させて目的細胞を計測する。

【操作上の注意】

1. 検体は新鮮なものを使用すること。
2. 溶血しにくい検体が希に存在するので，この場合には単核球分離検体を使用すること。
3. 異常細胞や培養細胞は，正常細胞に比べて高密度に抗原を持っている場合がある。このような場合は，抗体量を増やして試験を行うこと。
4. 正常細胞では問題のない抗体濃度でも，白血病検体などでは，陽性率の低下をきたす場合がある。従って，標識抗体の調製には，用法・用量を守り，過剰な希釈は行わないこと。
5. 採血後は常温で保存し，6 時間以内に試験を行うことが望ましい。検体の冷所保存は避けること。特に白血球細胞などは，保存によって急激に陽性率の低下をきたす場合があるので注意すること。
6. 検体が多い場合は試薬の汚染防止面・効率面から，試薬を先に分注し，後から検体を加える方法を勧める。
7. 試薬は秤取量が少ないので，分注の際は試験管壁に伝わらせ，確実に添加すること。
8. 試薬の汚染を防ぐため，マイクロピペットのチップは，試薬ごとに取り替えること。
9. 細胞を懸濁するときはできるだけ泡立てないようにほぐすこと。
10.試験管及び遠心管はシリコン処理製品を用いる方が細胞の損失が少なく適している。
11.細胞分離剤を使用する場合は，細胞回収率を向上させるため，重層する際は液面を乱さないように慎重に行うこと。
12.固定後，24 時間以上保存した後の測定の際には，一旦 PBS で洗浄後，再度 PBS に浮遊させて測定すること。
13.反応後，固定を行わない場合は，遮光して 4℃で保存し，1 時間以内，最長でも 2 時間以内に測定すること。
14.蛍光物質は光に当てると蛍光が減衰するので，抗体の保管はもちろん，インキュベーションの際もアルミホイルで周りを包むなどして，遮光状態にすること。
15.フローサイトメーターは検出感度，蛍光補正（コンペンセーション）が適正になるように前もって調整してから使用すること。

【用法・用量（操作方法）】

1. 必要な器具及び試薬
(1) 蛍光標識陰性コントロール
［形状・構造等（キットの構成）］の項を参考にし，本蛍光標識抗体イムノグロブリンサブクラスと蛍光色素の一致したものを使用する。
(2) 赤血球溶血剤
(3) PBS
(4) BSA（ウシ血清アルブミン）または FCS（仔ウシ血清）
(5) パラホルムアルデヒド
(6) NaCl
(7) ディスポーザブルガラス製試験管
(8) 抗凝固剤入り採血管
(9) マイクロピペット，パスツールピペット，ピペット
(10) Vortex ミキサー
(11) 血球計算盤
(12) 遠心器
(13) アスピレーター
(14) アイスバス
(15) フローサイトメーター
(16) 単核球分離液

2. 検体の取扱い
≪全血使用の場合≫
抗凝固剤入り採血管に静脈血を採取し，これを検体とする。

≪単核球分離細胞使用の場合≫
(1) 抗凝固剤入り採血管に静脈血を 3mL 採取する。
(2) 静脈血と等量の PBS を加え，2 倍に希釈する。
(3) 分離液 6mL を試験管に入れ，（2）で希釈した静脈血を穏やかに加える。
(4) 1500×g で 5 分間遠心分離する。
(5) 単核球層を分離層が混合しないように注意しながら，ピペットで採取する。
(6) 単核球層に 1%BSA または 1%FCS 加 PBS を加え，単核球を浮遊させる。
(7) 1500×g で 5 分間遠心分離する。
(8) アスピレーターで上清を除く。
(9) 上記（6）～（8）の操作を 2 回繰り返す。
(10) PBS に単核球を浮遊させる。
(11) 血球計算盤にて細胞数を約 10×10^6 個／mL に調製する。

3. 試薬の調製法
そのまま希釈せずに使用する。
・試薬は使用前に常温にもどすこと。
・試薬は至適濃度に調製されているので，使用の際は希釈をしないこと。

4. 操作法
≪全血使用の場合≫
(1) 試験管に下記のようにピペットで採取する。

	試験管 A（検体）	試験管 B（盲検）
検体	100μL	100μL
蛍光標識抗体	10μL	－
蛍光標識陰性コントロール	－	10μL

(2) 穏やかに混和し，4℃暗所にて 30 分間インキュベーションする。
(3) 2mL の溶血試薬をそれぞれの試験管に加え，穏やかに混合する。
(4) 300×g で 5 分間遠心分離する。
(5) 液量が約 50μL 残るように上澄液を吸引する。
(6) 2%BSA または FCS 加 0.01mol／L PBS を 3mL 加え，穏やかに Vortex にて混合する。
(7) 300×g で 5 分間遠心分離する。
(8) 液量が約 50μL 残るように上澄液を吸引する。
(9) 固定液として PBS に溶解させた 1%パラホルムアルデヒド 0.3mL を Vortex にて撹拌しながら加える。その後速やかにミキサーにて撹拌する。
(10) フローサイトメーターによって分析する。

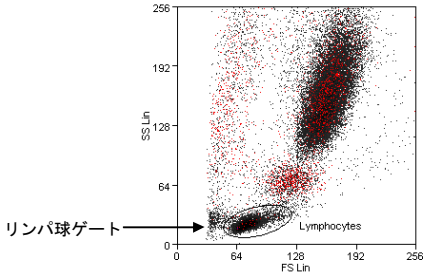
≪単核球分離細胞使用の場合≫
(1) 試験管に下記のようにピペットで採取する。

	試験管 A（検体）	試験管 B（盲検）
検体	100μL	100μL
蛍光標識抗体	10μL	－
蛍光標識陰性コントロール	－	10μL

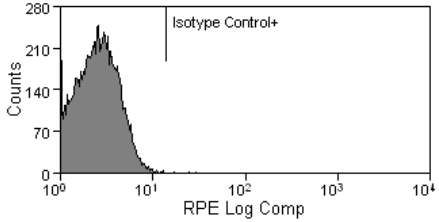
(2) 穏やかに混和し，4℃暗所にて 30 分間インキュベーションする。
(3) 2%BSA または FCS 加 0.01mol／L PBS にて 2 回洗浄する。
(4) 2%BSA または FCS 加 0.01mol／L PBS に再浮遊させる。
(5) 固定を行う場合は，沈査に 0.5mol／L NaCl 加パラホルムアルデヒドを 1mL 添加する。
(6) フローサイトメーターによって分析する。

【測定結果の判定法及び判定に係る注意事項】

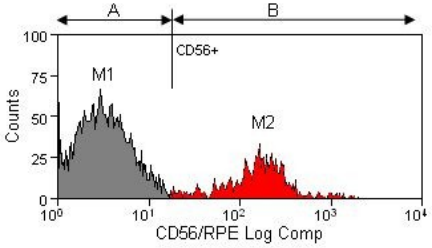
1. 測定結果の判定法
   (1) フローサイトメーターで陽性細胞を解析する場合は，各々のフローサイトメーターの取扱い説明書に従い操作する。
   (2) リンパ球部分にゲートをかける。



   (3) 蛍光標識抗体陰性コントロールを反応させた検体を測定し，ヒストグラムの陰性領域・陽性領域を確定する。



   (4) 蛍光標識抗体陰性コントロールを測定した結果より確定した領域に基づいて，試験対象検体のヒストグラムの陰性部分と陽性部分を区別し，B の部分を陽性細胞，A の部分を陰性細胞と判定する。



   (5) 細胞総数（M1＋M2）に対する陽性細胞数（M2）の百分率を算出する。
   - 正常参考値：10～35(%)
   - 励起波長：488nm　測定波長：570nm

2. 判定上の注意
   (1) 検体をフローサイトメトリーで分析する際，あらかじめ肉眼で細胞を観察することを勧める。細胞数を算定する際は，数のみならず，細胞の形態，大きさ，生存率，赤血球の混入を観察し，どのように gate を設定するべきかを考慮しておくとよい。
   (2) 陽性細胞率は，患者の年齢，性差，人種，喫煙習慣などの環境条件，紫外線照射，運動量，外傷，薬物投与の有無等の患者の状態及び検体の採取や保存の方法・採取後の時間経過によっても変化する場合があるので，注意すること。
   (3) 免疫不全症などの異常検体では一般の正常人からの検体とはかなり異なった現象が認められることがあるので注意すること。
   (4) 強い細胞自家蛍光は高いバックグラウンドの原因となる。
   (5) 死細胞は細胞膜の透過性が更新して細胞膜内まで抗体が進入し，かつ非特異に染色されるので偽陽性となる場合が多い。

【性能】

1. 感度
   蛍光標識抗体をトリス塩酸緩衝液（0.05mol／L pH7.6）で 2 倍，4 倍に希釈したものを用い，用法及び用量欄の記載内容に従い試験する時，同一の陽性検体を測定した場合の陽性率は，原液で試験した場合の陽性率を 100%とすると，それぞれ 87.4～100.4%，90.1～104.2%の範囲内にある。

2. 正確性
   健常人の末梢血を検体として試験した場合，末梢血リンパ球，単球及び顆粒球における陽性細胞率（%）は以下の通りである。

リンパ球	単球	顆粒球
18.4～25.92%	6.79～30.33%	3%以下

3. 同時再現性
   用法及び用量欄の記載内容に従い，同一陽性検体を 10 回同時に測定する時，陽性率の CV 値は 4.59%以下である。

4. 相関性
   本蛍光標識抗体と同一原理を採用している市販品と比較した場合，次の通り，良好な相関性が得られた。

蛍光標識抗体	検体数 (n)	相関係数 (r)	回帰式
CD56（C5.9）／RPE	66	0.9975	y=0.9821x ＋0.3358

【使用上又は取扱い上の注意】

取扱い上（危険防止）の注意

1. 検体には，HBV，HIV など，感染のおそれのあるものもあるので，取扱いには十分注意すること。
2. 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用すること。
3. 試薬を口で吸い上げないこと。
4. 試薬が皮膚や粘膜に直接接触することを避けること。万一触れた場合は，多量の水で洗い流すこと。
5. 製品中の容器・付属品等は他の目的に転用しないこと。
6. 試薬はアジ化ナトリウムを含んでいる。アジ化ナトリウムは鉛や銅と反応して起爆性の高い金属化合物を生成するため，容器の落下・衝撃による破損がないように丁寧に取り扱うこと。

使用上の注意

1. 試薬は 2～8℃で遮光して保存すること。
2. 試薬はなるべく早く使用し，有効期限を過ぎた試薬は使用しないこと。
3. 試薬は直射日光に当てないこと。
4. 試薬は微生物に汚染されないように注意すること。
5. 異なるロットの試薬は混ぜて使用しないこと。
6. 同一ロットの試薬であっても試薬を注ぎ足さないこと。
7. 使用後はキャップを堅く締めておくこと。

廃棄上の注意

1. 試薬はアジ化ナトリウムを含んでいる。アジ化ナトリウムは鉛や銅と反応して起爆性の高い金属化合物を生成するため，廃棄の際は多量の水で希釈して廃棄すること。
2. 検体に接触した器具・試薬及び試薬容器等は感染の危険性があるものとし，オートクレーブ等で 121℃ 20 分間滅菌処理するか，または 1vol%次亜塩素酸などの消毒液に一晩浸して処理すること。
3. 使用後の容器を廃棄する場合には，廃棄物に関する規定に従って，医療廃棄物または産業廃棄物等区別して処理すること。

【貯蔵方法，有効期間】

貯蔵方法：遮光して 2～8℃で保存
有効期間：2 年

【包装単位】

蛍光標識抗体	Code No.	容量
CD56（C5.9）／RPE	R7251	1mL（100test 用）

陰性コントロール	Code No.	容量
IgG2b（Mouse）／RPE	X0951	1mL（100test 用）

【主要文献】

1. Poggi A. CD56. CD Guide. In: Mason D, Andre P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens.　Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harogate, United Kingdom.　New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p.805-806.
2. Cost P. NK4. CD56 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucosyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov. 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p.271-2
3. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of leu-19(CD56) leukosyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. J Exp med 1989; 169: 2233-8
4. Saalmuller A, *et.all.* Summary of the animal homologue section of HLDA8. Cellular Immunology 236; 2005: 51-58

【文献請求及び問い合わせ先】

ダコ・ジャパン株式会社　薬事部
〒600-8493
京都市下京区四条通西洞院東入郭巨山町 18 番地
ヒラオカビル
TEL：075-211-3674

【製造販売業者の名称及び住所】

ダコ・ジャパン株式会社
〒600-8493
京都市下京区四条通西洞院東入郭巨山町 18 番地
ヒラオカビル
TEL：075-211-3675　　FAX：075-211-1755